

Kết quả xác định tên khoa học và phân tích hàm lượng acid clorogenic của các mẫu kim ngân hoa thu tại Hải Dương và Hà Nam

Trần Thị Lan, Nguyễn Quỳnh Nga, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Hương, Đặng Văn Hùng*

Viện Dược liệu

Ngày nhận bài 24/11/2021; ngày chuyển phản biện 29/11/2021; ngày nhận phản biện 28/12/2021; ngày chấp nhận đăng 31/12/2021

Tóm tắt:

Tổng số 6 mẫu kim ngân hoa được thu thập ở các địa điểm thuộc TP Chí Linh, tỉnh Hải Dương và huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam. Kết quả giám định tên khoa học của 6 mẫu thu thập cho thấy, có 4 mẫu thuộc loài *L. macrantha* (D. Don) Spreng., 1 mẫu thuộc loài *L. confusa* DC. và 1 mẫu thuộc loài *L. japonica* Thunb.. Hàm lượng acid clorogenic của các mẫu thu thập biến động từ 0,011 đến 0,304%. Trong đó, mẫu thuộc loài *L. japonica* Thunb. có hàm lượng acid clorogenic cao nhất (0,304%), tiếp đến là *L. confusa* DC. (0,055%), các mẫu thuộc loài *L. macrantha* (D. Don) Spreng. có hàm lượng acid clorogenic trong khoảng 0,011-0,021%. Việc giám định tên khoa học và phân tích hàm lượng acid clorogenic giúp nhận diện các loài kim ngân hoa hiện đang có ở 2 tỉnh Hải Dương và Hà Nam, chọn ra được loài có chất lượng dược liệu (hàm lượng acid clorogenic) cao để trồng trong sản xuất.

Từ khóa: acid clorogenic, kim ngân hoa.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Chi *Lonicera* - kim ngân hoa trên thế giới có khoảng 180 loài, phân bố ở vùng Bắc Phi, châu Âu, Bắc Mỹ và châu Á. Ở Việt Nam, có 11 loài *Lonicera* phân bố tự nhiên từ miền Bắc cho tới Tây Nguyên.

Trên thế giới nhiều loài thuộc chi *Lonicera* được sử dụng làm thuốc để chữa các bệnh mụn nhọt, mẩn ngứa, dị ứng, viêm gan... Trong đó, loài kim ngân hoa (*L. japonica* Thunb.) là cây thuốc quan trọng đã được sử dụng hàng ngàn năm ở Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc... để điều trị viêm gan, biến chứng gan, cúm, vết thương và ung thư [1]. Kim ngân hoa là vị thuốc chủ đạo trong nhiều bài thuốc cổ phương như Ngân tiêu tán, Ngũ vị tiêu độc ẩm, Tiên phương hoạt mệnh ẩm. Y học hiện đại cũng đã có nhiều nghiên cứu chứng minh các tác dụng sinh học của kim ngân hoa như kháng khuẩn, chống viêm, chống oxy hóa, kháng virus... [2, 3].

Do có giá trị y học cao nên kim ngân hoa đã được khai thác từ lâu và đến nay đang dần cạn kiệt trong tự nhiên, vì vậy việc đưa loài cây này vào gây trồng và nhân rộng để đáp ứng nhu cầu về dược liệu là cần thiết.

Hiện nay, người dân chủ yếu thu thập kim ngân hoa từ tự nhiên hoặc mua ở các đại lý cây giống về trồng mà chưa xác định rõ tên khoa học cũng như chất lượng dược liệu của nguồn giống. Do đó, việc giám định tên khoa học và phân tích hàm lượng hoạt chất chính (acid clorogenic) của các mẫu kim ngân hoa là cần thiết để có cơ sở lựa chọn giống cây phù hợp khi trồng sản xuất dược liệu. Phạm vi

của nghiên cứu này tập trung xác định tên khoa học kết hợp phân tích các mẫu kim ngân hoa thu tại TP Chí Linh, tỉnh Hải Dương và huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Tổng số 6 mẫu kim ngân hoa thu thập ở các điểm sinh thái khác nhau ở TP Chí Linh, tỉnh Hải Dương và huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam được sử dụng để giám định tên khoa học và phân tích hàm lượng acid clorogenic (bảng 1).

Bảng 1. Ký hiệu và nơi thu thập các mẫu kim ngân hoa trong thí nghiệm.

TT	Ký hiệu	Nơi thu thập
1	KN 01	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương
2	KN 02	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương
3	KN 03	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương
4	KN 04	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương
5	KN 05	Sao Đỏ, Chí Linh, Hải Dương
6	KN 06	Thanh Tâm, Thanh Liêm, Hà Nam

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu thực vật:

- Thu thập mẫu ngoài thực địa: mẫu phục vụ phân tích thẩm định tên khoa học là mẫu tươi thu từ cây đang mọc hoặc trồng ngoài thực địa, mẫu là những đoạn cành lá mang hoa/quả có chiều dài 20-40 cm [4].

*Tác giả liên hệ: Email: hungdangvdl@gmail.com

Results of the chlorogenic acid content assessment and scientific name identification of collected *Lonicera* samples in Hai Duong and Ha Nam provinces

Thi Lan Tran, Quynh Nga Nguyen,
Thi Phuong Nguyen, Thi Huong Nguyen, Van Hung Dang*

National Institute of Medicinal Materials

Received 24 November 2021; accepted 31 December 2021

Abstract:

A total of 6 *Lonicera* samples were collected in different ecological areas in Chi Linh town, Hai Duong province and Thanh Liem commune, Ha Nam province. The result of scientific name identification of 6 collected samples showed that 4 samples are *Lonicera macrantha* (D. Don) Spreng. species, 1 sample is *L. confusa* DC. species, and 1 sample is *L. japonica* Thunb. species. Chlorogenic acid contents of all collected samples are from 0.011 to 0.304%. Results also showed that the acid chlorogenic content of *L. japonica* Thunb. species is highest (0.304%), followed by *L. confusa* DC. species (0.055%). The chlorogenic acid contents of *L. macrantha* (D. Don) Spreng. are from 0.011-0.021%. These studies will help to identify *Lonicera* species currently in Hai Duong and Ha Nam provinces and select high-quality species (chlorogenic acid content) for plant production.

Keywords: chlorogenic acid, *Lonicera*.

Classification number: 3.4

- Phân tích mẫu và giám định tên khoa học: các mẫu sau khi thu thập về được đánh mã số từ KN 01 đến KN 06 và gửi đến Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu để phân tích, giám định tên khoa học và mô tả hình thái theo các bước sau:

+ Phân tích đặc điểm hình thái của các bộ phận sinh dưỡng, đặc biệt là các bộ phận sinh sản (hoa và quả). Trong phân tích, sử dụng kính lúp để quan sát và máy ảnh để chụp ảnh các bộ phận của mẫu.

+ Giám định/định tên khoa học: sử dụng phương pháp so sánh hình thái, đối chiếu với khóa phân loại và bản mô tả trong các thực vật chí: *Cây cỏ Việt Nam* (2000) và *Thực vật chí Trung Quốc - Flora of China* (2005) để xác định tên khoa học cho loài [1, 5].

+ Đối chiếu mẫu nghiên cứu với bộ mẫu lưu tại Phòng tiêu bản của Viện Dược liệu.

+ Mô tả hình thái theo nguyên tắc đi từ tổng thể bên ngoài đến chi tiết bên trong, từ lớn đến nhỏ. Mô tả mẫu ở dạng sống, thân, lá và hoa.

Phân tích hàm lượng acid chlorogenic của các mẫu kim ngân hoa thu thập: mẫu phục vụ phân tích hàm lượng acid chlorogenic được thu và đánh mã số cùng với mẫu phục vụ thẩm định tên khoa học, các mẫu thu về được sấy khô và gửi phân tích ở Viện Dược liệu.

Định tính acid chlorogenic: định tính acid chlorogenic bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (theo chuyên luận Kim ngân hoa, Dược điển Việt Nam V) [6], cùng các bước thực hiện như sau:

- Bản mỏng: Silica gel 60 F254.

- Dung môi khai triển: Butyl acetal - acid formic - nước (7:2,5:2,5).

- Dung dịch thử: lấy 0,2 g bột dược liệu thêm 10 ml methanol (thuốc thử - TT) chiết siêu âm trong 20 phút, để nguội, lọc. Bóc hơi dịch lọc trên cách thủy đến cạn. Hòa tan cặn trong 2 ml ethanol (TT) được dung dịch thử.

- Dung dịch chất đối chiếu: hòa tan acid chlorogenic chuẩn trong ethanol (TT) để được dung dịch có nồng độ 1 mg/ml.

- Dung dịch dược liệu đối chiếu: lấy 0,2 g bột kim ngân hoa (mẫu chuẩn), chiết như mô tả ở phần dung dịch thử.

- TT: hỗn hợp dung dịch acid oxalic/acid boric 10%, tỷ lệ 2:1.

- Cách tiến hành: chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun hỗn hợp dung dịch acid oxalic/acid boric 10% (TT) tỷ lệ 2:1, sấy bản mỏng ở nhiệt độ 120°C trong 5 phút. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 365 nm trước và sau khi phun TT. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch dược liệu đối chiếu hoặc có vết cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch chất đối chiếu.

Định lượng acid chlorogenic: acid chlorogenic được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng [6], với các bước thực hiện như sau:

- Pha động: Acetonitril - dung dịch acid phosphoric 0,4% (13:87).

- Dung dịch chuẩn: hòa tan acid chlorogenic chuẩn trong methanol 50% (TT) để được dung dịch có nồng độ 0,15 mg/ml.

- Dung dịch thử: cân chính xác khoảng 0,5 g bột dược

liệu (qua rây số 355) vào bình nón nút mài dung tích 100 ml, thêm chính xác 50,0 ml methanol 50% (TT), đậy nắp, cân xác định khối lượng. Chiết siêu âm trong 30 phút, để nguội, cân lại và bổ sung khối lượng mất đi bằng methanol 50% (TT) nếu cần, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- Điều kiện sắc ký: cột Ascentis C18 (5 μ m $\times$ 250 $\times$ 4,6 mm).

- Detector quang phổ tử ngoại: đo ở bước sóng 327 nm.

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

- Thể tích tiêm: 10 μ l.

- Cách tiến hành:

+ Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn và ghi sắc ký đồ. Số đĩa lý thuyết của cột tính theo pic của acid chlorogenic không được ít hơn 1000.

+ Tiến hành sắc ký dung dịch thử và ghi sắc ký đồ. Tính hàm lượng acid chlorogenic trong dược liệu dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng của acid chlorogenic chuẩn.

Kết quả và bàn luận

Kết quả phân tích, thẩm định tên khoa học của các mẫu thu thập

Sử dụng máy ảnh và kính lúp để quan sát và phân tích đặc điểm của các bộ phận: thân, lá, lá bắc, hoa, quả.

Sau khi phân tích các mẫu kim ngân hoa, tham khảo các tài liệu hiện có, kết hợp đối chiếu với tiêu bản của chi *Lonicera* đang lưu giữ tại Khoa Tài nguyên Dược liệu (có số hiệu 1826, 5008, 7649), đã xác định được tên khoa học của 6 mẫu kim ngân hoa thu thập (KN 01, KN 02, KN 03, KN 04, KN 05, KN 06). Tên Việt Nam, tên khoa học và tên đồng danh của từng mẫu như sau:

- Mẫu KN 01, KN 02, KN 03 và KN 04 đều thuộc cùng 1 loài, có tên Việt Nam, tên khoa học và tên đồng danh như sau:

Tên Việt Nam: kim ngân hoa to, kim ngân lông.

Tên khoa học: *L. macrantha* (D. Don) Spreng..

Tên đồng danh (synonym): *Caprifolium macranthum* (D. Don) Spreng..

Mô tả cây: dây leo bằng thân quấn, phân cành nhiều. Thân và cành già hóa gỗ nhiều; vỏ thân già màu nâu có thể bong ra; thân có lông cứng xen lẫn lông tuyến rải rác. Lá mọc đối, phiến bầu dục, dài 4-11 cm, rộng 3-4,5 cm, mặt dưới lá có lông cứng và lông tuyến rải rác. Cụm hoa ở nách lá, dạng xim co, có cuống mang 2-3 hoa; lá bắc hình mác hoặc dài, hoa to màu vàng, đài có 5 răng nhỏ, tràng cao 5-6 cm, môi trên 4 thùy, môi dưới 1 thùy, mặt ngoài ống tràng có lông tuyến rải rác; bầu 3 ô. Quả mọng 7-8 mm, màu đen (hình 1).



L. macrantha (D. Don) Spreng. KN 01



L. macrantha (D. Don) Spreng. KN 02



L. macrantha (D. Don) Spreng. KN 03



L. macrantha (D. Don) Spreng. KN 04



L. confusa DC. KN 05



L. japonica Thunb. KN 06

Hình 1. 6 mẫu kim ngân hoa thu thập tại Hải Dương và Hà Nam.

Mẫu nghiên cứu: địa điểm thu mẫu là Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương, ngày thu mẫu: 24/3/2021, người thu mẫu: Nguyễn Quỳnh Nga, số hiệu mẫu: KN 01, KN 02, KN 03 và KN 04.

- Mẫu KN-05 có tên Việt Nam, tên khoa học và tên đồng danh như sau:

Tên Việt Nam: kim ngân núi, kim ngân rỏi, kim ngân lẫn, sơn ngân hoa.

Tên khoa học: *L. confusa* DC..

Tên đồng danh: *L. confusa* var. *glabrocalyx* R.H. Miao & X.J. Liu.

Mô tả cây: cây leo bằng thân quấn, phân cành. Thân và cành già hóa gỗ nhiều; cành non lúc đầu có lông, sau hơi đỏ. Lá mọc đối, cuống hơi dẹt, có rãnh ở mặt trên; phiến lá hình trái xoan - mũi mác, dài 2-8 cm, rộng 1-4 cm; gốc tròn hay hình nêm, chóp phiến nhọn; nhẵn ở mặt trên, có lông mịn ở mặt dưới; lá già xẻ thùy không đều. Cụm hoa mọc ở nách lá gần ngọn, thành xim hai hoa; lá bắc hình mác hoặc dài. Hoa trắng sau chuyển sang vàng. Đài ngắn, có 5 răng, dài 3-4 cm, mặt ngoài nhẵn, mặt trong có lông; tràng hình ống, đôi khi ống tràng hơi cong. Nhị 5, đính ở ống tràng, thò ra khỏi ống tràng. Bầu nhẵn hoặc có lông. Quả hình cầu, màu đen (hình 1).

- Mẫu KN-06 có tên Việt Nam, tên khoa học và tên đồng danh như sau:

Tên Việt Nam: kim ngân hoa, nhẵn đông, kim ngân nhạt.

Tên khoa học: *L. japonica* Thunb..

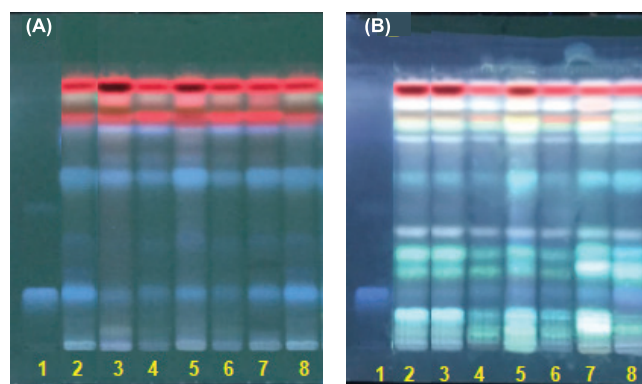
Tên đồng danh: *L. brachypoda* Siebold..

Mô tả cây: cây leo bằng thân quấn, phân cành nhiều. Thân và thân già hóa gỗ nhiều; cành non có lông đơn ngắn và tuyến có cuống, sau nhẵn, màu hơi đỏ có vân. Lá mọc đối, hơi dày, hình trứng thuôn, dài 4-7 cm, rộng 2-4 cm, gốc tròn, đầu nhọn, mặt trên có lông thưa, mặt dưới có lông dày; cuống lá dài 5-6 mm, có lông. Hoa mọc từng đôi một ở các nách lá gần ngọn; lá bắc dạng lá hình trứng đến elip. Khi mới nở, cánh hoa màu trắng, sau chuyển sang vàng nhạt, mùi thơm nhẹ; đài 5 răng mảnh, có lông; tràng hoa có phần dưới hợp thành ống, phần trên chia làm 2 môi, môi dưới 4 thùy bằng nhau, môi trên 1 thùy; nhị 5, thò ra ngoài cánh hoa. Quả hình cầu hoặc hình trứng, dài khoảng 5 mm, màu đen khi chín (hình 1).

Kết quả phân tích hàm lượng acid chlorogenic của các mẫu kim ngân hoa

Kết quả định tính acid chlorogenic của các mẫu kim ngân hoa thể hiện ở hình 2. Kết quả quan sát bản mỏng dưới ánh

sáng tử ngoại ở bước sóng 365 nm, trước và sau khi phun thuốc thử cho thấy: sắc ký đồ của mẫu thử có độ đậm nhạt khác nhau nhưng đều có vết cùng màu sắc và giá trị R_f với vết của dược liệu kim ngân của loài *L. caulis cum folium* đối chiếu và có một vết cùng màu sắc và giá trị R_f với vết của acid chlorogenic đối chiếu. Như vậy, các mẫu kim ngân hoa phân tích của các mẫu thu thập tại Hải Dương và Hà Nam đều có vết của acid chlorogenic.



Hình 2A. Sắc ký đồ TLC định tính kim ngân hoa. Hình ảnh quan sát dưới đèn tử ngoại bước sóng 365 nm trước khi phun TT. Hình 2B. Sắc ký đồ TLC định tính kim ngân hoa. Hình ảnh quan sát dưới đèn tử ngoại bước sóng 365 nm sau khi phun TT.

Hình 2. Kết quả định tính acid chlorogenic của các mẫu kim ngân hoa.

Ghi chú: vết 1: chuẩn acid chlorogenic; vết 2: kim ngân cuống của loài *L. caulis cum folium* đối chiếu (mẫu chuẩn); vết 3-8: các mẫu kim ngân hoa kiểm nghiệm (mẫu KN 01 đến KN 06).

Hàm lượng acid chlorogenic là một trong những chỉ tiêu chính để đánh giá chất lượng dược liệu của các loài kim ngân hoa. Chỉ tiêu này cao chứng tỏ chất lượng dược liệu tốt và ngược lại. Kết quả định lượng acid chlorogenic của các mẫu kim ngân hoa thu thập được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng acid chlorogenic trong các mẫu kim ngân hoa kiểm nghiệm.

STT	Ký hiệu mẫu	Nơi thu thập	Tên khoa học	Hàm lượng acid chlorogenic (%)	Ghi chú
1	KN 01	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương	<i>L. macrantha</i> (D. Don) Spreng.	0,011	Hàm lượng % acid chlorogenic được tính theo mẫu khô kiệt
2	KN 02	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương	<i>L. macrantha</i> (D. Don) Spreng.	0,012	
3	KN 03	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương	<i>L. macrantha</i> (D. Don) Spreng.	0,021	
4	KN 04	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương	<i>L. macrantha</i> (D. Don) Spreng.	0,011	
5	KN 05	Sao Đỏ, Chí Linh, Hải Dương	<i>L. confusa</i> DC.	0,055	
6	KN 06	Thanh Tâm, Thanh Liêm, Hải Dương	<i>L. japonica</i> Thunb.	0,304	

Kết quả định lượng acid chlorogenic của các mẫu thu thập cho thấy: hàm lượng acid chlorogenic biến động khá lớn giữa các loài, mẫu KN 06 thuộc loài *L. japonica* có hàm lượng acid chlorogenic cao nhất (0,304%), tiếp đến là mẫu KN 05

thuộc loài *L. confusa* DC. (0,055%). Các mẫu khác thuộc loài *L. macrantha* (D. Don) Spreng. có hàm lượng acid clorogenic trong khoảng 0,011-0,021%.

Dược điển Việt Nam V có chuyên luận kim ngân cuộng, tuy nhiên chưa có chỉ tiêu định lượng hoạt chất. *Dược điển Trung Quốc 2015* có chuyên luận kim ngân cuộng cho loài *L. japonica* Thunb. quy định hàm lượng acid clorogenic không được thấp hơn 0,1%. Như vậy chỉ có mẫu KN 06 đạt yêu cầu.

Kết luận

Trong 5 mẫu thu thập tại TP Chí Linh, tỉnh Hải Dương có 4 mẫu thuộc loài *L. macrantha* (D. Don) Spreng., 1 mẫu thuộc loài *L. confusa* DC. chưa ghi nhận sự có mặt của loài kim ngân hoa - *L. japonica* Thunb. ở các điểm thu thập tại TP Chí Linh, tỉnh Hải Dương. Mẫu thu thập tại huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam thuộc loài *L. japonica* Thunb..

Mẫu KN 06 thuộc loài *L. japonica* Thunb. có chất lượng dược liệu (cuộng và lá) cao nhất trong 6 mẫu thu thập (hàm

lượng acid clorogenic đạt 0,304%), đạt theo *Dược điển Trung Quốc 2015*. Các mẫu khác thuộc loài *L. macrantha* (D. Don) Spreng. (KN 01-KN 04) và *L. confusa* DC. (KN 05) có hàm lượng acid clorogenic đạt 0,011-0,055%, đều thấp hơn so với tiêu chuẩn (theo *Dược điển Trung Quốc 2015*).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] https://efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10159.
- [2] Đỗ Huy Bích và cs (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, **tập 2**, tr.106-110.
- [3] L.J. Wang (2010), "The study progress of *Lonicera japonica*", *Medical Information*, **8**, pp.2293-2296 (in Chinese).
- [4] Nguyễn Nghĩa Thìn (2007), *Các phương pháp nghiên cứu thực vật*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [5] Phạm Hoàng Hộ (2000), *Cây cỏ Việt Nam*, Nhà xuất bản Trẻ, **quyển 3**, tr.226-228.
- [6] Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V (Chuyên luận kim ngân cuộng)*, tr.1221-1222.